

活性氧检测试剂盒（DHR 123）

ROS Assay Kit (DHR 123)

产品编号	产品名称	规格
DEM100	ROS Assay Kit (DHR 123)	100T

产品简介

活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 包括超氧化物、过氧化氢、羟自由基以及具有高氧化活性的活性氧代谢产物。活性氧主要由中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞为代表的免疫细胞受到刺激后产生，其它体细胞在应激条件下线粒体电子传递异常也会产生活性氧。免疫细胞产生的活性氧能够抵御微生物的感染。在病理条件下，过度产生的活性氧也会导致机体损伤和引发各种疾病。

DHR 123 (Dihydrorhodamine 123) 是活性氧检测的荧光探针，可通过自由扩散进入细胞，并与细胞内活性氧反应生成能够发射绿色荧光的 R 123 (Rhodamine 123) 而停留在细胞内，可以用于细胞内活性氧的检测。从而用于病理生理研究或药物筛选。本试剂盒利用能够刺激多种免疫细胞产生活性氧的佛波酯 (Phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA) 为阳性对照。

试剂组成

组份编号	组份名称	规格	数量
DEM100-1	DHR 123 (2 mM)	100 μ l/管	1
DEM100-2	PMA (50 μ g/ml)	50 μ l/管	1
—	说明书	份	1

需要而未提供的试剂及器材

1. 细胞
2. 细胞培养用 PBS
3. 系列可调节量程移液器及吸头
4. 干净的试管、离心管及 24 孔板
5. 流式细胞仪

储存条件

-20℃ 储存，保质期 12 个月。

注意事项

1. DHR 123 溶液请尽量避免反复冻融，可以适当分装。
2. 初次使用试剂时，请适当离心后使用。

- 初次测定活性氧，可取小鼠骨髓细胞， 1.0×10^6 细胞/孔，接种到 24 孔板中，加入终浓度 2 μM 的 DHR 123，然后利用终浓度 50 ng/ml PMA 刺激 1 小时，检测活性氧作为阳性对照。
- 本产品仅限专业人员用于科学研究，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明

- 细胞接种及处理：取需要测定的细胞，利用培养基调整到合适浓度后，接种到 24 孔板中。如果是贴壁细胞，提前一天接种到 24 孔板中，24 小时更换新鲜培养基。然后加入 DHR 123 探针(利用培养基稀释)至终浓度 2 μM ，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15min，然后加入活性氧产生刺激剂，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一定时间。如果是评价药物活性，可以在加入刺激剂前后加入药物共同孵育。

具体检测体系设置如下表所示：

	对照组	刺激组
细胞	+	+
DHR 123	+	+
刺激剂	-	+

- 孵育结束后，收集细胞，4 $^{\circ}\text{C}$ ，300g 离心 5 分钟，弃上清；然后加入 1 ml 细胞培养用 PBS，再次 4 $^{\circ}\text{C}$ ，300g 离心 5 分钟；0.5 ml PBS 重悬细胞，进行流式细胞测定（FITC 通道）。

数据处理

利用 FlowJo 软件处理流式细胞检测源数据，对各组样品细胞荧光分布作图或统计各组样品细胞平均荧光强度。如下图所示：

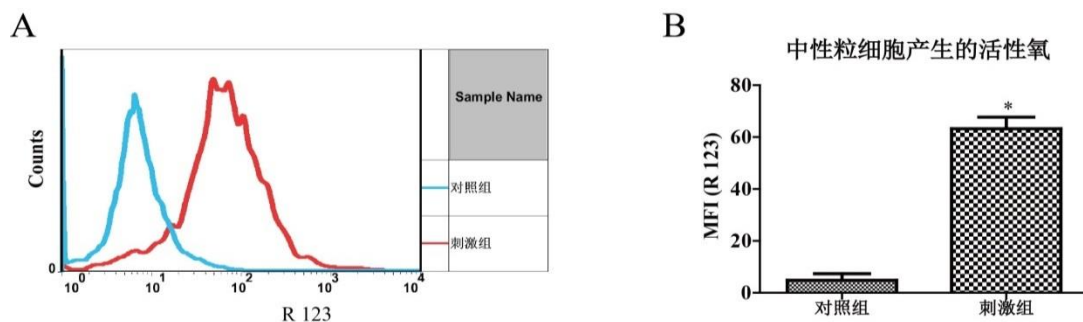


图 1：DHR 123 检测中性粒细胞产生的活性氧。取 Balb/c 小鼠骨髓细胞，接种到 24 孔板中，加入 DHR 123 探针后，加入 PMA 刺激 1 小时，然后收集细胞进行流式测定，分析中性粒细胞活性氧的产生。* P<0.05 vs 对照组。

参考文献

- Tkalcevic, J., Novelli, M., Phylactides, M., Iredale, J.P., Segal, A.W., Roes, J., 2000. Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. Immunity, 12: 201-210.